AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), cild 64, №5-6, səh. 14-19 (2009)

Şiff Əsaslı Indol Asilhidrazidləri və Sulfonlar Sinfindən Olan Maddələrin β-Qlükuronidaza Fermentinə Təsiri (*in vitro* Tədqiqat)

X.R. Rüstəmova
AMEA Botanika İnstitutu,Patamdar şossesi 40, Bakı AZ1073, Azərbaycan Respublikası,
e-mail: xayale81@yahoo.com

Şiff əsaslı indol asilhidrazidləri sinfindən 12 maddə, sulfonlar sinfindən isə 7 maddə β–qlükuronidaza fermenti üçün skrininq olunmuş və fermenti inhibirləşdirən fəal maddələr üçün İC50 (fermentin fəallığını 50% inhibirləşdirən maddənin konsentrasiyası) müəyyən olunmuşdur. Şiff əsaslı indol asilhidrazidləri sinfindən skrininq olunan 12 maddədən 5-də fəallıq müşahidə olunmamışdır, 6-da standart inhibitorla müqayisədə (D-qlükuron turşusu 1,4-lakton, 48,4±1,25 µl) yaxşı, 1-də isə zəif fəallıq müşahidə olunmuşdur. Sulfonlar sinfindən isə skrininq olunan 7 maddədən birinin çox güclü potent inhibitor olduğu müəyyənləşdirilmişdir. Müqayisə nəticəsində məlum olmuşdur ki, maddənin tərkibində halogenlər olarsa, həmin maddə β - qlükuronidaza fermenti üçün yaxşı inhibitordur və inhibirləşmə dərəcəsi F→Cl→Br qanunauyğunluğu ilə artır.

GİRİŞ

β-qlükuronidaza fermenti heyvanlarda, bitkilərdə və bakteriyalarda aşkar edilmişdir (Fishman, 1974). Ferment bədəndə əmələ gələn benzo [α] piren qlükuronidləri kimi β-qlükuronidlərin və təbii bitki qlükuronidlərinin hidrolizində iştirak edir.

β-D-qlükuronozid+H2O ↔ spirt+D-qlükuronat

Qlükuronidlərin hidrolizi β-qlükuronidaza ilə bir çox toxumalarda, xüsusilə də qaraciyər, böyrək, dalaq, daxili epiteli, endokrin və reproduktiv orqanlarda həyata keçirilir (Dutton, 1980). β–qlükuronidaza ksenobiotiklərin və endogen maddələrin qlükuronidləşməsinin tənzimində mühüm rol oynayır (Belinsky et al., 1984).

Subhüceyrəvi fraksionlaşdırma yolu ilə məməlilərin toxumalarında β-qlükuronidaza tipik lizosomal ferment kimi aşkar edilmişdir (Fishman et al., 1967). Pineda və əməkdaşları müəyyənləşdirmişlər ki, qaraciyərin zədələnməsi və qaraciyər xərçəngi bu fermentin miqdarının qanda artması ilə əlaqədardır (Pineda et al., 1959). Həmçinin hesab edilir ki, insanlarda və siçanlarda bağırsaq bakteriyası β–qlükuronidazası bağırsaq xərçənginin törədilməsi ilə əlaqəlidir (Goldin et al., 1980; Renwick et al., 1976). β-qlükuronidaza benzo [α] piren qlükuronidləri öddə deqradasiya edir və bu öd axarları ilə bağırsağa ekskresiya olunur, beləliklə karsinogen bağırsağı zərbə altına qoyur. Sonradan Takeda sübut etmişdir ki, siçanlarda azoksimetanla (AOM) və β–qlükuronidazanın inhibitoru olan N-tsiklo-5-O-asetil-2,4-O(p-metoksibenzilidin)-D-qlükaro-1 –amid-6,3-laktonla qidalanma zamanı yalnız AOM-lə qidalanmadan fərqli olaraq yüksək riskli bağırsaq xərçəngi effektiv olaraq azalır (Takeda et al., 1982). Bundan başqa β-qlükuronidaza inhibitorları qlükuronidləşmədən sonra müəyyən maddələrin karsinogenliyini öddən normal ekskresiya edərək azaldır (Walaszek et al., 1984). Bu sahədə xeyli işlər aparılmışdır. Alimlər bu fermenti inhibirləşdirən maddələr axtarırlar. Bunlardan biri də silimarindir. Silimarin maddəsi təmizlənməmiş ekstraktdır, hepatoprotektiv maddə kimi istifadə olunur və 0.8mq/ml konsentrasiyada β–qlükuronidazanın aktivliyini 53% inhibirləşdirir. Sağlam insanın və bağırsaq xərçənginə tutulmuş insanın nəcisindəki β–qlükuronidaza 0,03-0,015 mq/ml konsentrasiyada silibinlə, silimarinlə və qlükuron turşusu 1,4-laktonla inhibirləşdirilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, β–qlükuronidazanın fəallığını bu yolla azaltmaq olar. Silimarin və ondan ayrılan təmiz maddə olan silibin siçanlarda CCl4-lə təsirdən sonra qan zərdabında artan fermentin fəallığını azaltmışdır (Kim et al.,1994).

İnsanlarda β–qlükuronidazanın qida modulyasiyası aşkar olunmamışdır, lakin qəbul olunur ki, müəyyən qidalar bu fermentin fəallığını dəyişə bilər. Qida maddəsi D-qlükar turşusu β–qlükuronidazanın potent inhibitoru olan D-qlükaro-1,4-laktonun sələfidir. Bu kifayət miqdarda çox saylı meyvə və tərəvəz də daxil olmaqla bitki qidalarında tapılmışdır (Walaszek et al., 1996; Dwivedi, 1990). *İn vivo* D-qlükar turşusu metaboliti, D-qlükaro-1,4-lakton karsinogenlərin detoksifikasiyasını artıra bilər və heyvanlarda kimyəvi yolla induksiya olunmuş karsinogenləri β-qlükuronidazanı inhibirləşdirməkə inhibirləşdirə bilər. Siçanlarda əlavə kalsium qlükaratı verməklə

qaraciyər mikrosomlarında və qan zərdabında β-qlükuronidaza fəallığını azaltmaq olar (Dwivedi et al., 1990).

Bizim məqsədimiz β-qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirməkə ksenobiotiklərin qlükuronidləşmə yolu ilə bədəndən xaric olunmasına kömək etmək və yuxarıda qeyd olunan arzuolunmaz xəstəliklərdən orqanizmi qorumaqdır. Bu məqsədlə 2 sinfə daxil olan yeni sintetik maddələrdən istifadə olunmuşdur. Şiff əsaslı asilhidrazidləri sinfindən 12 maddə skrininq olunmuşdur və β-qlükuronidaza fermentini ingibirləşdirən fəal maddələrin İC50-si (fermentin fəallığını 50% ingibirləşdirən maddənin konsentrasiyası) müəyyən olunmuşdur. Onlardan 5-də fəallıq müşahidə olunmamışdır, 6-da standart inhibitorla müqayisədə (48,4±1,25) yaxşı, 1-də isə zəif fəallıq müşahidə olunmuşdur. Digər sinif isə sulfonlardır. Sulfonlar sinfindən 7 maddə skrininq olunmuşdur. Onlardan 1-i çox güclü potent inhibitordur.

MATERİAL VƏ METODLAR

Reagentlər, həlledicilər, mənbəyi *E.coli* olan β-qlükuronidaza fermenti, substrat (p-nitrofenil- β-D-qlükuronid) və standart inhibitor (D-qlükuron turşusu 1,4-lakton) "Sigma Aldrich" kompaniyasından alınmışdır. Tədqiq olunan maddələr Pakistan İslam Respublikasının Karaçi Universitetinin HEJ tədqiqat İnstitutunun maddələr bankından alınmışdır. Bütün fermentativ reaksiyalar R.A.Collins metodu ilə, lakin müəyyən modifikasiya etməklə yerinə yetirilmişdir (Collins et al., 1997). İnhibirləşdirici fəallıq bu formulla hesablanmışdır:

İnhibirləimə% = {(E-S)/E}x100

E - fermentin test materialsız fəallığı, S - fermentin test materialı ilə birlikdə fəallığıdır.

Sonradan fəal maddələrin İC50-si təyin olunmuşdur. İC50-nin təyin olunması fəal olan maddələrin konsentrasiyasını (12 konsentrasiyada) artırmaqla aparılmışdır. İC50 qiyməti "Ez-Fit Enzyme Kinetic Program" (Perrella Scientific İnc., Amherst, U.S.A) proqramından istifadə etməklə hesablanmışdır.

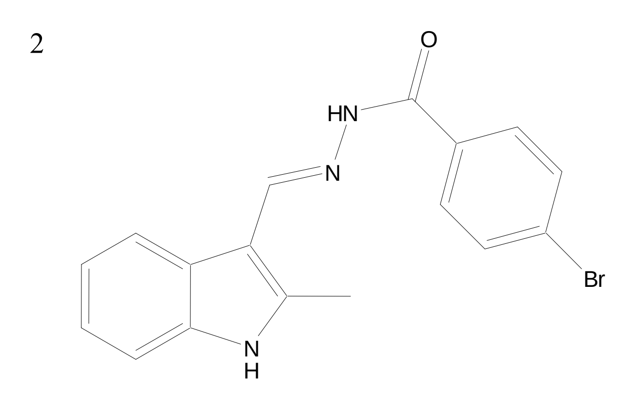
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Bizim məqsədimiz β-qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirməkə ksenobiotiklərin qlükuronidləşmə yolu ilə bədəndən xaric olunmasına kömək etmək və yuxarıda qeyd olunan arzuolunmaz xəstəliklərdən orqanizmi qorumaqdır. Bu yolda 2 sinfə daxil olan yeni sintetik maddələrdən istifadə olunmuşdur. Şiff əsaslı asilhidrazidləri sinfindən 12 maddə skrininq olunmuşdur və β–qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirən fəal maddələrin İC50-si müəyyən olunmuşdur. Onlardan 5-də fəallıq müşahidə olunmamışdır, 6-da standart inhibitorla müqayisədə (48,4±1,25) yaxşı, 1-də isə zəif fəallıq müşahidə olunmuşdur. Digər sinif isə sulfonlardır. Sulfonlar sinfindən 7 maddə skrininq olunmuşdur.Onlardan 1-i çox güclü potent inhibitordur. Cədvəl 1 və 2-də fəal olan maddələr və müqayisə üçün bəzi fəal olmayan və ya çox zəif fəal olan maddələr verilmişdir. Cədvəl 1-dən göründüyü kimi, Şiff əsaslı indol asilhidrazidləri sinfindən olan maddələr arasından yalnız halogenlərə malik olan törəmələr β-qlükuronidaza fermenti üçün yaxşı inhibitordur (Cədvəl 1 - 2,3,4 saylı maddələr). Əgər bu sinfə daxil olan maddələrin benzohidrazid həlqəsində digər qruplar məsələr NO2 qrupu olarsa fəallıq müşahidə olunmayacaq (Cədvəl 1 - 1 saylı maddə). Benzohidrazid həlqəsində halogenlərin hər üçünün iştirakında maddənin yaxşı fəallıq göstərməsinə baxmayaraq fəallıq F→Cl→Br istiqamətində çoxalır. Ən yaxşı fəallıq 4-bromo-*N'*-[-(2-metil-1*H*-indol-3-il) metiliden]benzohidraziddə müşahidə olunmuşdur (11.34±0.62μM) (Cədvəl 1 - 2 saylı maddə). Benzohidrazid həlqəsində halogenlərdən savayı oksigen olduqda da yaxşı fəallıq müəyyən olunmuşdur (Cədvəl 1 - 5 saylı maddə). Cədvəldən göründüyü kimi, benzolhidrazid nikotinohidrazid həlqəsi ilə əvəz edildikdə zəif fəallıq müşahidə olunur (Cədvəl 1 - 6 saylı maddə) və bu fəallıq halogenlərlə olan fəallıqla müqayisə oluna bilməz. Biz bunun təsdiqini sulfonlar sinfinə daxil olan maddələr arasında da görürük. Göründüyü kimi, sulfonların heç biri β – qlükuronidaza fermenti üçün inhibitor deyil. Lakin, sulfonun bromlu törəməsi olan tribromometanfenilsulfon bu ferment üçün çox güclü potent inhibitordur (0.195 ± 0.000196 μM) (Cədvəl 2 - 2 saylı maddə).

TƏŞƏKKÜRLƏR

Elmi məsləhətlərinə görə Biofizika laboratoriyasının müdiri R.Ə.Həsənova, işdə göstərdiyi köməkliyə görə Pakistan İslam Respublikasının Karaçi Universitetinin HEJ tədqiqat İnstitutunun 404 saylı laboratoriyasının müdiri prof: M.İ.Choudhary-yə, tədqiq olunan maddələrin alınmasında iştirak etdiyinə görə prof: X.Xan və onun tələbələrinə öz təşəkkürümü bildirirəm.

Cədvəl 1. Şiff əsaslı indol asilhidrazidləri sinfi

1	Aktiv deyil Mol.küt: 322.32 N'-[-(2-metil-1H-indol-3-il)metiliden]-4-nitrobenzohidrazid
2	 11.34±0.62µl Mol.küt: 356.22 4-bromo-*N'*-[-(2-metil-1*H*-indol-3-il)metiliden]benzohidrazid
3	35.4 ± 0.32 µl Mol.küt: 295.31 4-fluoro-*N'*-[(2-metil-1*H*-indol-3-il)metiliden]benzohidrazid

4

16.24 ± 0.35 µl Mol.küt: 311.77

4-xloro-*N*'-[-(2-metil-1*H*-indol-3-il)metiliden]benzohidrazid

5

20.85 ± 0.19 µl Mol.küt: 293.32

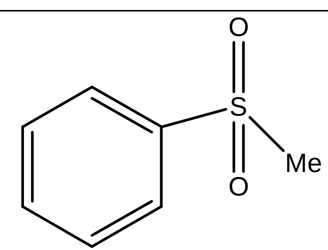
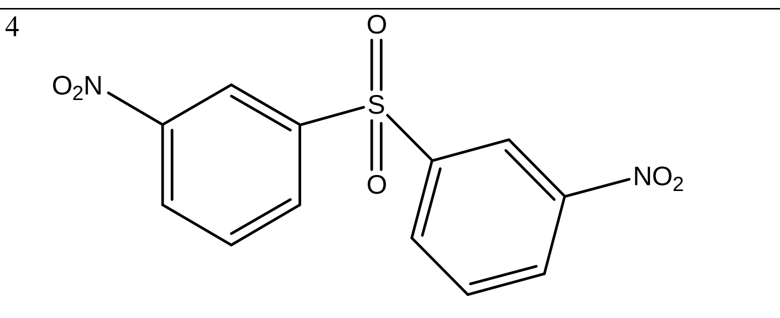
N'-[-1*H*-indol-3-ilmetiliden]-4-metoksibenzohidrazid

6

112.1± 1.13 µl Mol.küt: 278.31

N'-[(2-metil-1*H*-indol-3-il)metiliden]nikotinohidrazid

Cədvəl 2. Sulfonlar sinfi

1	Fəal deyil Mol.küt: 263.27 Nitrofenilfenil sulfon
2	0.195± 0.000196 µl Mol.küt: 392.89 tribromometanfenilsulfon
3	 Fəal deyil Mol.küt: 156.20 Metil fenilsulfon
4	 Fəal deyil Mol.küt: 308.27 3-nitrofenilsulfon

ƏDƏBİYYAT

Belinsky S.A., Kauffman F.C., Sokolove P.M., Tsukuda T., Thurman R.G. (1984) Calcium-mediated inhibition of glucuronide production by epinephrine in the perfused rat liver. J. Biol. Chem. **259:** 7705-7711.

Collins R.A., Ng T.B., Fong W.P., Wan C.C., Yeung H.W. (1997) Inhibition of glycohydrolase enzymes by aqueous extracts of Chinese medicinal herbs in a microplate format. Biochemistry and Molecular Biology International **42:** 1163-1169.

Kim D.-H., Jin Y. –H. et al. (1994) Silymarin and its components are inhibitors of β-Glucuronidase**,** Biol.Pharm.Bull **17(3):** 443-445.

Dutton G. J. (1980) Glucuronidation of Drugs and Other Compounds. CRC Press, Boca Raton, FL.

Dwivedi C., Heck W. J., Downie A. A., Larroya S., Webb T.E. (1990) Effect of calcium glucarate on _-glucuronidase activity and glucarate content of certain vegetables and fruits. Biochem. Med. Metab. Biol. **43:** 83-92.

Fishman W.H. (1974) "Methods of Enzymatic Analysis", 2nd ed., ed by H.U.Bergmeyer, Academic Press, New York: p. 929.

Fishman W.H., Goldman S.S, Delellis R. (1967) Nature (London) **213:** 457.

Goldin B.R., Swenson L., Dwyer J., Sexton M., Gorbach S.L., (1980) J.Natl.Cancer Inst. **64:** 255.

Pineda E.P., Goldbarg J.A., Banks B.M., Rutenburg A.M. (1959) Gastroenterology **36:** 202.

Renwick A.G, Drasar B.S. (1976) Nature (London) **263:** 234.

Takeda H., Hiraoka T., Hiramatsu Y., Yamamoto M. (1982) Cancer Res. **42:** 331.

Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E. (1984) Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumorigenesis by 2,5-di-*O*-acetyl-D-glucaro-1,4:6,3-dilactone, an in vivo glucuronidase inhibitor. C arcinogenesis **5:** 767-772.

Walaszek Z., Szemraj J., Hanausek M., Adams A.K., Sherman U. (1996) D-Glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterollowering effects of dietary D-glucarate in the rat. Nutr. Res. **16:** 673–681.

Х.Р. Рустамова

Влияние Соединений Класса Ацилгидразиды Шиффового Основания Индола и Класса Сульфонов на Фермент β-Глюкуронидаза (Эксперименты *In Vitro*)

Был произведен скрининг 12 соединений класса ацилгидразидов Шиффового основания индола, и 7 соединений класса сульфонов по отношению к β-глюкуронидазе, а также вычислен İC50 активных соединений (концентрация соединений, ингибирующая 50% активности фермента). Из 12 протестированных соединений класса ацилгидразиды Шиффового основания индола 5 являются неактивными, 6 обладают хорошой активностью по сравнению со стандартом (D-глюкуроновая кислота 1,4-лактона, 48,4±1,25 мкл), а 1 является слабым ингибитором. Среди 7 протестированных соединений класса сульфонов 1-ое соединение является очень потенциальным ингибитором. В результате сравнения соединений было установлено, что если в соединении присутствуют атомы галогенов, то эти соединения являются сильными ингибиторами β-глюкуронидазы и степень ингибирования увеличивается в следующем порядке F→ Cl →Br.

Kh.R. Rustamova

The Effect of Compounds Belonging Acylhydrazides Schiff Bases of Indol Classes and Sulphones Classes on β-Glucuronidase (*In Vitro* Research)

12 compounds from acylhydrazides schiff bases of indol classes and 7 compounds from sulphones classes were screened for β-glucuronidase and were determined IC50 (concentration of compound which can inhibit 50 % activity of enzyme). 5 compounds of 12 had not activity, 6 had good activity with compare standard inhibitor (D-saccharic acid 1,4-lacton 48.4± 1.25μl) and 1 has weak activity, while 1 compound is very potent inhibitor from sulphones classes. Comparison between compounds belonging two classes shows if there are halogens in the compounds then this compounds is good inhibitor for β-glucuronidase and level of inhibition increases with this law F→ Cl →Br.